

中脳視蓋領域の決定機構の解明とその戦略

著者	片平 立矢
号	2066
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/22611

氏 名（本籍）	かた 片 平 立 矢
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 0 6 6 号
学位授与年月日	平 成 16 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	中脳視蓋領域の決定機構の解明とその戦略

（主 査）

論文審査委員	教授 仲 村 春 和	教授 大 隅 典 子
	教授 小 椋 利 彦	

論文内容要旨

脊椎動物の脳は、神経管前方に前脳胞、中脳胞、後脳胞という基本的な枠組みから形成される。次に前脳胞は終脳と間脳に分かれ、中脳胞は中脳、菱脳胞は後脳と髄脳に分かれる。ショウジョウバエの *orthodenticle* のホモログである *Otx 2* は前脳、中脳の領域全体で発現しており、ノックアウトマウスでは前脳と中脳領域が欠損する。また後脳領域には *Gbx 2* が発現しており、ノックアウトマウスでは、中脳後脳境界部に異常が観察される。*Otx 2* の機能が欠損すると中脳が分化しなくなるが、*Otx 2* の強制発現によりどのような効果が得られるのか、また中脳・後脳境界で明瞭な境界を持って発現している *Gbx 2* との関係がどのような意義を持つのかと考え、*in ovo* エレクトロポレーション法を用いてニワトリ 2 日胚の後脳に *Otx 2* を異所的に発現させた。すると後脳に異所的な膨らみが形成され、組織学的に解析したところ視蓋特異的な層構造を形成していた。このことから *Otx 2* は予定後脳領域を中脳視蓋に分化転換させることがわかった。一方で遺伝子発現の解析を行ったところ、*Otx 2* は *Gbx 2* の発現を抑制し、後脳胞で *Otx 2* の異所的な発現の周りに *Fgf8* が誘導されていた。さらに正常胚の中脳に発現している遺伝子、*En 2*、*Pax 2/5* が後脳に異所的に誘導されていることも確認された。また共同研究者の佐藤は *Gbx 2* を中脳に強制発現させた。すると *Otx 2* が抑制され、視蓋領域が縮小した。さらに中脳領域で *Gbx 2* の発現の周辺部に *Fgf8* の発現が誘導された。これらのことから *Otx 2* と *Gbx 2* の抑制的な相互作用により中脳後脳境界が決定され、その発現境界に *Fgf8* の発現が誘導されることが示された（第一部）。

一方で Araki 等によって *En 2* を間脳に強制発現すると *Pax 2/5*、*Fgf8* を誘導し中脳へと分化することが示されたが、*En 2* は抑制因子であることから、*En 2* によって抑制されそれ自身は下流の遺伝子を抑制する因子の存在が予想され、そのスクリーニングが行われた。その候補遺伝子の機能解析の過程で簡便な遺伝子機能阻害法の必要性を痛感し、第二部の研究を行った。

ショウジョウバエと線虫で遺伝子の機能阻害の方法として RNAi (RNA interference) が用いられてきた。最近 20 塩基ほどの短い二本鎖 RNA (siRNA) を用いれば、哺乳類細胞でも RNAi 効果を発揮することが示された。さらにヘアピン型 RNA (shRNA) を発現するようにしたベクターを細胞に導入することで RNAi 効果を得られることが報告された。

そこで私は、shRNA を発現するベクターを *in ovo* エレクトロポレーション法を用いてニワトリ胚に導入し、ニワトリ胚での遺伝子の機能阻害法を実現しようと考えた。標的遺伝子には、中脳と後脳に発現している遺伝子 *En 2* を選んだ。中脳後脳領域には、*En 2* と同じ *engrailed* family である *En 1* も発現しており対照として用いることが出来る。siRNA の配列特異性と位置特異性を検証するために *En 2* ORF から 4 箇所選択した。*En 2*-150 は、*En 1* と一致する配列、*En 2*-582 は、*En 1* と 6 塩基違い、*En 2*-648 は、*En 1* と 2 塩基違い、*En 2*-846 は *En 1* と 8 塩基違い、さら

に En2-648 の任意の 4 塩基を置換した En2-648s4 を作製した。In ovo エレクトロポレーション 24 時間後に En2 と En1 の mRNA の発現を in situ ハイブリダイゼーションで検出した。En2-150 により En2, En1 の発現ともに抑制されていた。En2-582 は、En2 のみを抑制し、En2-648 により En2 の発現は強く抑制され、En1 も弱いながら抑制されていた。En2-846 は、En2, En1 ともに抑制することは出来なかった。En2-648s4 も En2, En1 を抑制することは出来なかった。時間を追って siRNA の遺伝子抑制効果を検証したところ、in ovo エレクトロポレーション 6 時間後から mRNA が分解され始め、12 時間後には、mRNA とタンパク質の発現の抑制が同じ箇所で行われていることが確認できた。また cHes5 は En2 に抑制されるが、En2-150 によって En2 の機能を阻害したところ予想どおり cHes5 の発現が峡部で誘導されていた。

本研究によりニワトリ胚においても siRNA による遺伝子の機能阻害が可能となった。配列特異性については、2 塩基違いまでは、RNAi 作用を持つことが示された。また siRNA の位置によって抑制作用に違いがあることがわかった。In ovo エレクトロポレーションと siRNA を組み合わせることによって、今後の遺伝子機能の解析が進んでいくことが期待される（第二部）。

博士論文としてこれらの結果を二部構成でまとめた。第一部は「中脳領域の決定機構」として、第二部は「ニワトリ胚での新しい遺伝子機能阻害法の開発：siRNA 発現プラスミドのエレクトロポレーション」とした。

第一部基礎論文

Interaction between *Otx2* and *Gbx2* defines the organizing center for the optic tectum. Katahira, T., Sato, T., Sugiyama, S., Okafuji, T., Araki, I., Funahashi, J. & Nakamura, H. 2000. *Mechanisms of Development* 91, 43-52.

第二部基礎論文

Gene silencing in chick embryos with a vector-based small interfering RNA system. Katahira, T. & Nakamura, H. 2003. *Development, Growth and Differentiation* 45, 361-367.

審査結果の要旨

脊椎動物の脳は、神経管前方に前脳胞、中脳胞、菱脳胞という基本的な枠組みから形成される。ショウジョウバエの *orthodenticle* のホモログである *Otx2* は前脳、中脳の領域全体で発現しており、ノックアウトマウスでは前脳と中脳領域が欠損する。また菱脳の前部である後脳領域には *Gbx2* が発現しており、ノックアウトマウスでは、中脳後脳境界部に異常が観察される。本研究はまず *Otx2* と *Gbx2* の脳の領域形成における役割を明らかにするため、*in ovo* エレクトロポレーション法をニワトリ胚で *Otx2* の強制発現実験を行った。*Otx2* を後脳胞に強制発現すると、後脳部に異所的な膨らみが形成され、その膨らみは視蓋特異的な層構造を形成していた。このことから *Otx2* は予定後脳領域を中脳視蓋に分化させることが示された。また *Otx2* は *Gbx2* の発現を抑制し、後脳胞で *Otx2* の異所的な発現の周りに *Fgf8* が誘導された。さらに正常胚の中脳に発現している遺伝子も異所的に誘導されていた。佐藤による *Gbx2* の強制発現実験の結果、*Otx2* が抑制され、視蓋領域が縮小した。さらに中脳領域で *Gbx2* の発現の周辺部に *Fgf8* の発現が誘導された。これらのことから *Otx2* と *Gbx2* の抑制的な相互作用により中脳後脳境界が決定され、その発現境界に *Fgf8* の発現が誘導されることが示された（第一部）。

一方、ニワトリ胚での遺伝子の機能解析において遺伝子機能阻害法の必要性を痛感し、第二部の研究を行った。ショウジョウバエと線虫で遺伝子の機能阻害の方法として RNAi (RNA interference) が用いられてきた。最近 20 塩基ほどの短い二本鎖 RNA (siRNA) を用いれば、哺乳類細胞でも RNAi 効果を発揮することが示された。さらにヘアピン型 RNA (shRNA) を発現するようにしたベクターを細胞に導入することで RNAi 効果を得られることが報告された。そこで shRNA を発現するベクターを *in ovo* エレクトロポレーション法を用いてニワトリ胚に導入し、ニワトリ胚での遺伝子の機能阻害法を開発した。標的遺伝子には、中脳と後脳に発現している遺伝子 *En2* を選んだ。siRNA の配列特異性と位置特異性を検証するために *En2* ORF から 4 箇所選択したが、中脳後脳領域には、同じファミリーに属する *En1* も発現しており対照として用いることが出来る。*En2*-150 は、*En1* と完全に一致する配列、*En2*-582 は、*En1* と 6 塩基違い、*En2*-648 は、*En1* と 2 塩基違い、*En2*-846 は *En1* と 8 塩基違う。*In ovo* エレクトロポレーション 24 時間後に *En2* と *En1* の mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにて検出したところ、*En2*-150、*En2*-582、*En2*-648 により *En2* の発現は抑えられていた。*En1* の発現は、完全に配列が一致する *En2*-150 によって強く抑制され、2 塩基違いの *En2*-648 により弱い抑制が見られた。4 塩基違うと抑制は見られなかった。*En2*-846 は *En1*、*En2* ともに抑制することはできなかったため、siRNA をデザインするには配列の一致と位置特異性も考慮しないといけない。時間経過を見たところ、*in ovo* エレクトロポレーション 6 時間後から mRNA が分解され始め、12 時間後には、mRNA とタンパク質の双方の発現が抑制されていた。

本研究の第一部は中脳の領域形成のメカニズムの解明、また第二部での siRNA によるニワトリ胚の遺伝子機能阻害法の確立はともに価値の高い研究であり、博士の学位に値するものと判断される。